

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**BIOLOGICKÁ AKTIVITA VYBRANÝCH DROG TRADIČNÍ ČÍNSKÉ
MEDICÍNY**

THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE SELECTED DRUGS OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2017

Martina Vítková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady, poskytnuté materiály a pomoc při vypracovávání této diplomové práce. Děkuji také za pomoc Petře Němcové při práci v laboratoři.

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Tato práce vznikla za grantové podpory SVV 260 412.

V Hradci Králové, květen, 2017

jméno, příjmení

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	CÍL PRÁCE	10
3	<u>TEORETICKÁ ČÁST</u>	11
3.1	Testované rostliny	11
3.1.1	<i>Magnolia officinalis</i>	11
3.1.1.1	Botanický popis rostliny a zařazení.....	11
3.1.1.2	Výskyt.....	12
3.1.1.3	Popis drogy	12
3.1.1.4	Obsahové látky	13
3.1.1.5	Biologické účinky a použití.....	13
3.1.1.6	Toxicita a vedlejší účinky	15
3.1.2	<i>Houttuynia cordata</i>	15
3.1.2.1	Botanický popis rostliny a zařazení.....	15
3.1.2.2	Výskyt.....	16
3.1.2.3	Popis drogy	16
3.1.2.4	Obsahové látky	17
3.1.2.5	Biologické účinky a použití.....	18
3.1.2.6	Toxicita.....	19
3.1.3	<i>Paeonia lactiflora</i>	19
3.1.3.1	Botanický popis rostliny a zařazení.....	19
3.1.3.2	Výskyt.....	20
3.1.3.3	Popis drogy	20
3.1.3.4	Obsahové látky	22
3.1.3.5	Biologické účinky a použití.....	22
3.1.3.6	Toxicita.....	23

3.1.4	<i>Psoralea corylifolia</i>	23
3.1.4.1	Botanický popis rostliny a zařazení.....	23
3.1.4.2	Výskyt.....	24
3.1.4.3	Popis drogy	24
3.1.4.4	Obsahové látky	25
3.1.4.5	Biologické účinky a použití.....	25
3.1.4.6	Toxicita.....	26
3.1.5	<i>Typha orientalis</i>	27
3.1.5.1	Botanický popis rostliny a zařazení.....	27
3.1.5.2	Výskyt.....	28
3.1.5.3	Popis drogy	28
3.1.5.4	Obsahové látky	28
3.1.5.5	Biologické účinky a použití.....	29
3.2	Biologická aktivita	29
3.3	Testy toxicity	29
3.3.1	OECD Guidelines pro testování chemických látek.....	31
3.4	Testování toxicity na <i>Artemia salina</i>	32
3.4.1	<i>Artemia salina</i>	32
4	<u>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</u>	34
4.1	Materiál a vybavení	34
4.2	Příprava extraktů	35
4.3	Provedení testu biologické aktivity	35
4.4	Vyhodnocení.....	37
5	<u>VÝSLEDKOVÁ ČÁST</u>	38
5.1	<i>Magnolia officinalis</i>	39
5.2	<i>Houttuynia cordata</i>	41

5.3	<i>Psoralea corylifolia</i>	43
5.4	<i>Typha orientalis</i>	45
6	DISKUZE	47
7	ZÁVĚR	49
8	ZDROJE	50
9	PŘEHLED OBRÁZKŮ	57
10	PŘEHLED TABULEK	58

SEZNAM ZKRATEK

CDK4	cyklin dependentní kinasa 4
CRP	C-reaktivní protein
EC ₅₀	střední efektivní koncentrace
ED ₅₀	střední efektivní dávka
FDA	Food and Drug Administration
GABA	kyselina γ-aminomáselná
GLUT-4	glukózový transportér typu 4
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSV-1	<i>Herpes simplex virus 1</i>
HSV-2	<i>Herpes simplex virus 2</i>
IFNγ	interferon γ
IgE	imunoglobulin E
IL-4	interleukin 4
IL-6	interleukin 6
LC ₅₀	střední letální koncentrace
LD ₅₀	střední letální dávka
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
LOAEL	lowest observed adverse effect level
MAO	monoaminoxidáza
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NO	oxid dusnatý
NOAEL	no observed adverse effect level
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PGE ₂	prostaglandin E ₂
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
TČM	tradiční čínská medicína
TD ₅₀	střední toxická dávka
TNF	tumor nekrotizující faktor

1 ÚVOD

Lidské zdraví je jedním z nejdůležitějších atributů našeho života. Pokud není v pořádku, zhoršuje se tím rapidně kvalita života. Může se objevit zhoršení nálady, izolace od společnosti, pracovní neschopnost, atd. Z tohoto důvodu se lidé již od nepaměti snaží hledat způsoby, jak nemoci léčit a lidé, kteří se tomu věnují, jsou ve všech společnostech váženými osobami.

V raných počátcích se lidé dlouhá staletí léčili pouze pomocí produktů, které získávali z přírody (rostliny, živočichové a jejich produkty, nerosty). Později, díky rozvoji vědy a techniky, přestali spoléhat pouze na přírodu a začali se věnovat izolaci jednotlivých látek z rostlin nebo živočichů. Ty se pak snažili za laboratorních podmínek vyrábět sami. Vznikaly tak syntetické látky, které měly svoji předlohu v přírodě. Vznikaly také látky, jejichž chemická struktura byla vynalezena v laboratoři a neměla tedy předlohu z přírody.

Jak syntetické, tak i zcela přírodní látky po podání do lidského organismu vyvolávají vedle zamýšleného účinku i další vedlejší účinky, které jsou ve většině případů vnímány jako nežádoucí. Před započítím jejich využívání v praxi je proto nutné zjistit, jaké další účinky mohou mít tyto látky na organismus a v jaké míře se vyskytují. Z těchto údajů se určí, zda převažují benefity užívání nad riziky. Pokud léčivo těmto podmínkám vyhoví, je možné jeho uvedení do praxe.

Před prvním podání látky lidem se její užívání nejprve testuje na zvířatech. Při tom je však potřeba brát ohled na samotná zvířata. Nesmí docházet k jejich týrání, jejich umírání by mělo být bezbolestné a jejich počty co nejnižší. Z tohoto důvodu používání zvířat při testování léčiv upravuje zákon. Dále byl také vytvořen koncept pojmenovaný 3R, což zkracuje začáteční písmena jednotlivých záměrů (reduction, replacement, refinemet). Cílem tohoto programu je při testování nahradit zvířata, snížit jejich počty a snížit utrpení zvířat. ^[64]

Tradiční čínská medicína (TČM) se od naší západní medicíny liší v celé svojí podstatě. Snaží se nemoc zachytit již před jejím propuknutím a zabránit jejímu rozvoji. Zdraví chápe především jako rovnováhu mezi silami jin a jang. Její porušení vede k nemoci.

TČM má taky bohatou a dlouholetou tradici ve fytoterapii. Západní medicína čerpá některé poznatky ve fytoterapii právě z čínské medicíny. Většinou je však nevyužívá tak jako TČM k udržení rovnováhy jin a jang, ale k léčení nemocí a jejich symptomů.

V této práci je vybráno 5 rostlin, které se využívají hlavně v TČM. Mají velké množství blahodárných účinků na lidský organismus, což predikuje jejich velký potenciál k využití i v naší medicíně. Nejprve je ale nutno provést zkoušky jejich toxicity. K tomu byl vybrán organismus *Artemia salina*, který zároveň splňuje podmínky konceptu 3R. Pokud bude naměřená toxicita nízká, bude možné prohlásit, že extrakty z těchto rostlin jsou bezpečné pro užití člověkem a bude moct být započato testování jejich užívání na lidech.

2 CÍL PRÁCE

Cílem mojí diplomové práce bylo experimentálně zjistit hodnotu LC_{50} u vybraných drog z tradiční čínské medicíny, konkrétně *Magnoliae officinalis cortex*, *Houttuyniae herba*, *Paeoniae radix alba*, *Psoraleae fructus* a *Typhae pollen*.

Náplň diplomové práce:

- Vypracování osnovy práce a úvodní rešerše na zadané téma
- Příprava vodných extraktů drog TČM
- Vlastní testování biologické aktivity
- Zhodnocení dosažených výsledků a porovnání získaných hodnot v kontextu jiných prací
- Sepsání práce

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Testované rostliny

3.1.1 *Magnolia officinalis*

3.1.1.1 Botanický popis rostliny a zařazení

Říše: Rostliny (*Plantae*)

Oddělení: Krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: Nižší dvouděložné (*Magnoliopsida*)

Řád: Šácholanotvaré (*Magnoliales*)

Čeleď: Šácholanovité (*Magnoliaceae*)

Rod: Šácholan (*Magnolia*)

Český název rostliny je šácholan zahradní a patří do čeledi šácholanovité, latinsky *Magnoliaceae*. Je to vřdyzelený nebo opadavý strom nebo keř vysoký 6 – 20 metrů. Kůra je aromatická, rezavě šedé až tmavě šedé barvy. Listy jsou podlouhlé, eliptického tvaru, na povrchu hladké a lesklé, řapíkaté s velkými palisty, které na počátku obklopují stonek, později však opadnou a zanechají jizvu. U mladých listů je rubová strana narezlá a plstnatá. Květy jsou voňavé a dosahují délky až 25 cm. Květ se skládá ze 3 kališních lístků a z 6 korunních lístků, jejichž barva je bílá až narůžovělá. Pestík je plstnatý. Kveté v období pozdního jara a v létě. Její plody se podobají šiškám jehličnatých stromů a jsou 10 – 12 cm dlouhé. Měchýřky obsahují velká červená semena, která z nich visí na dlouhých poutkách. ^{[1][2][3][38]}



Obrázek 1: *Magnolia officinalis* © [4]

3.1.1.2 Výskyt

Rostlina původně pochází ze Severní Ameriky. Roste planě v horách střední a západní Číny, kde vyhledává teplejší a vlhčí místa. Nesnáší tvrdší zimy. Upřednostňuje kyselé půdy. [1][8][38]

3.1.1.3 Popis drogy

TČM využívá z této rostliny kůru (*Magnoliae officinalis cortex*) a drogu tradičně nazývá Hou Po. Získává se z 15 – 20 let starých keřů a oloupává se z kmene nebo z kořenů v období od dubna do června. Nejprve se nechá oschnout, poté se upravuje pařením. Až změkne, sroluje se do trubiček a ty se nechají dosušit ve stínu. Dále se nechá nasáknout vodou, oloupe se z ní vnější vrstva, která se usuší. [8]

Drogu tvoří usušené proužky kůry, které mají z vnější strany drsný povrch a šedě hnědou barvu, zevnitř je povrch hladký a fialově hnědý. Droga je aromatická a má štiplavou až mírně trpkou chuť. [8]

Tabulka 1: Přípravky obsahující *Magnoliae officinalis cortex* [5][6]

	Český název	Výrobce	Indikace
Shu Gan Wan	Utišení větrné bouře	TCM Bohemia s.r.o.	Nadýmání, bolest břicha, průjem
Ban Xia Hou Po Pian	Spláchnutí pecky slivoně	TCM Bohemia s.r.o.	Pocit knedlíku v krku, tlak na prsou, pokašlávání

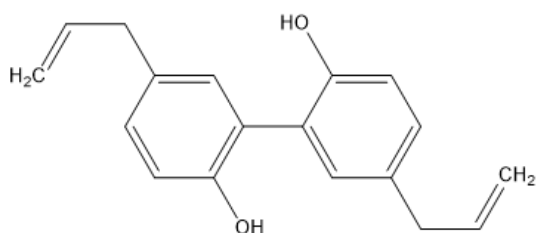


Obrázek 2: *Magnoliae officinalis cortex* © ^[7]

3.1.1.4 Obsahové látky

Z rostliny se v období květu využívají květy (*Flos magnoliae*). V období časného jara se sbírá kůra (*Cortex magnoliae*), později na jaře list (*Folium magnoliae*). ^[1]

Kůra a semena se používají v tradiční přírodní medicíně v Koreji, Číně a Japonsku. Její obsahové látky jsou honokiol, magnolol a 4-*O*-methylnonokiol. Rostliny z čeledi *Magnoliaceae* dále obsahují methylcafeat, denudatin B, sinapylalkohol, seskviterpenové laktony (costunolid, parthenolid a costunoliddipoxid) a lignany (eudesmin, magnolin, yangambin a epimagnolin B). ^[2]



Obrázek 3: Magnolol

3.1.1.5 Biologické účinky a použití

Tradiční medicína používala kůru a květ na léčbu gastrointestinálních poruch, úzkosti a alergií. Systémově má kůra účinky protirakovinné, protizánětlivé a

antioxidační. V centrálním nervovém systému má účinek protistresový, proti úzkosti a antidepresivní. Působí proti rozvoji Alzheimerovy choroby a mrtvice. V kardiovaskulárním systému způsobuje relaxaci cév, má antisklerotický účinek a působí antiagregačně. V gastrointestinálním systému účinkuje proti obstrukci jícnu, proti žaludečním vředům, protiprůjmově a hepatoprotektivně. [2]

Jak již bylo řečeno, obsahové látky z šácholanu prokázaly široké působení proti rakovině. Honokiol způsobuje buněčnou smrt B buněk při chronické lymfoidní leukémii, přičemž působí selektivně na maligní buňky. Při léčbě angiosarkomu prokázal až 50% snížení růstu tumoru. Honokiol inhibuje růst kolorektálního karcinomu a dokáže působit apoptózu buněk rakoviny prostaty. Mechanismus protirakovinného účinku je dán upregulací exprese proapoptopických genů a downregulací exprese protiapoptopických genů, zastavení buněčného cyklu a inhibicí NF-κB aktivity. Magnolol působí také na karcinom plic. Jeho malé množství inhibuje proliferaci buněk, větší množství indukuje apoptózu těchto buněk. Při rakovině štítné žlázy magnolol způsobuje apoptózu nebo nekrózu buněk. Magnolol prokázal inhibiční účinky na rozvoj rakoviny kůže. [2]

Dále účinkují na neurální poruchy. Bylo prokázáno, že honokiol má pozitivní účinky proti úzkosti. Dále, že extrakt z šácholanu v kombinaci s hořčíkem má pozitivní účinek na menopauzální projevy. 4-*O*-methylhonokiol má také účinky proti anxietě. Mechanismus účinku spočívá v aktivaci chloridového kanálu přes GABA receptor. [2]

Magnolol v kombinaci s honokiolem zmírňuje deprese. Antidepresivně působí směs magnololu a honokiolu se zázvorem, která působí synergicky na serotoninový a noradrenalinový systém. [2]

Látky z šácholanu mají schopnost působit na Alzheimerovu nemoc. Podávání magnololu a honokiolu dokáže zlepšit učení a paměť. Mají také preventivní účinek na věkem podmíněný cholinergní deficit. Ukázalo se, že magnolol a honokiol dokáží zvýšit uvolňování acetylcholinu v hippokampu. 4-*O*-methylhonokiol dokáže chránit mozek před zhoršováním paměti. [2]

Magnolol a honokiol svým působením v centrálním nervovém systému způsobují svalovou relaxaci. [9]

Podání honokiolu dokáže zmenšit rozsah mozkové mrtvice. [2]

Honokiol a magnolol mají antinociceptivní účinky, což je způsobeno inhibicí glutamových receptorů. Inhibují také neurotransmitter pro signalizaci bolesti –

substance P a prostaglandiny, což jsou mediátory zánětu. Honokiol a magnolol mají také antikonvulzivní účinky. Zvyšují práh záchvatů. [2]

Magnolol a honokiol mají protizánětlivé účinky. Magnolol dokáže redukovat prostaglandin E2 a leukotrien B4. Honokiol snižuje TNF- α a IL-6, což dokazuje, že může snižovat autoimunitní odpověď. [2]

Magnolol a honokiol jsou také účinnými antioxidanty. Honokiol snižuje adhezi oxidovaného LDL molekul ve vlnách. Magnolol má protektivní účinky na vaskulární systém a může redukovat aterosklerózu. Ve srovnání s kyselinou acetylsalicylovou má honokiol podobné účinky na srážení krve, magnolol pouze slabé. [2]

Sloučeniny z šácholanu vykazují terapeutický efekt na nemoci žaludku díky relaxaci hladkého svalstva gastrointestinálního traktu. Také snižují tvorbu střevních plynů. Mají i antiastmatické účinky a to díky antialergickému mechanismu. Sloučeniny z šácholanu mají díky antioxidační aktivitě hepatoprotektivní efekt. [2]

3.1.1.6 Toxicita a vedlejší účinky

Ethanolický extrakt z šácholanu byl zkoušen na kmenech *Salmonella typhimurium* a na *Escheria coli*, přičemž nebyly prokázány žádné mutagenní účinky. Bylo prokázáno, že nemá ani genotoxické účinky. Ani testy na myších neprokázaly zvýšení počtu erytrocytů. LD₅₀ byla po perorálním podání spočítána na >50 g/kg a na 8,5 g/kg při injekčním podání u myší. Při 14denním podávání 5 nebo 10 g/kg se objevilo zvýšení alaninaminotransferasy a kreatininu u krys. Při perorálním podávání extraktu krysám se po 90 dnech neobjevily žádné známky poškození. Všechny tyto testy dokazují minimální toxicitu extraktu z šácholanu a téměř žádné vedlejší účinky. [2]

3.1.2 *Houttuynia cordata*

3.1.2.1 Botanický popis rostliny a zařazení

Říše: Rostliny (*Plantae*)

Oddělení: Krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: Nižší dvouděložné (*Magnoliopsida*)

Řád: Pepřovité (*Piperales*)

Čeleď: Saururovité (*Saururaceae*)

Rod: Touleň (*Houttuynia*)

Český název rostliny je houtunie srdčitá a patří do čeledi saururovitých, latinsky *Saururaceae*. Je to vytrvalá bylina poléhavého charakteru s plazivým oddenkem. Dorůstá výšky kolem 0,4 metru. Listy má srdčité, střídavé a řapíkaté. Jejich povrch je hladký. Květy jsou drobné, oboupohlavné a žluté. Vyrůstají v kláscích a kvetou na začátku léta. Plodem je tobolka, semena jsou drobná a mají vejčitý tvar. Tato rostlina je typická svým nepříjemným zápachem. ^{[11][14][15][38]}

Rostlina se používá v tradiční medicíně v Koreji, Japonsku Číně a Indii. Jsou jí přisuzovány účinky protizánětlivé, antipyretické, detoxikační, antiulcerózní, podporuje vysušení hnisu a užívá se po kousnutí hmyzem. ^[14]



Obrázek 4: *Houttuynia cordata* © ^[10]

3.1.2.2 Výskyt

Typickou oblastí, kde houtunie roste, jsou subtropické lesy, kde vyhledává vlhčí místa a břehy potoků a řek. Je to původní druh hornatých oblastí východní Asie. ^{[11][8]}

3.1.2.3 Popis drogy

TČM využívá nať (*Houttuyniae herba*) a drogu tradičně nazývá Yu Xing Cao. Rostlina se sbírá na přelomu léta a podzimu a nechá se usušit na slunci. Usušená droga je charakteristická svým rybím zápachem, chuť má štiplavou. ^[8]

Tabulka 2: Produkty obsahující *Houttuyniae herba* ^[12]

	Český název	Výrobce	Indikace
Welcome Fragrance	Vítání vůně	The Three Treasures	Zahlenění dýchacích cest



Obrázek 5: *Houttuyniae herba* © ^[13]

3.1.2.4 Obsahové látky

H. cordata obsahuje několik druhů alkaloidů, konkrétně aristolactam B, piperolactam A a aristolactam A. ^[14]

V oleji z *H. cordata* bylo analyzováno 22 sloučenin. Mezi hlavní patří β -myrcen, 1-nonanol, terpineol, methylnonylketon, bornylacetát, kyselina dekanová, caryofylen, ethylester kyseliny dokosanové. ^[16]

Rostlina je bohatá na polyfenolické látky, zejména flavonoidy (kyselina chlorogenová, hyperosid, quercetin, rutin, quercetrin, glabranin, 7-O-methylglabranin, procyanidin, pelargonidin, cinanserin hydrochlorid). Dále obsahuje kyselinu palmitovou, stearovou, olejovou, laurylaldehyd, kaprylaldehyd a karboxylové sloučeniny, např. houttuynin. ^{[17][54]}



Obrázek 6: Houttuynin

3.1.2.5 Biologické účinky a použití

Vodný extrakt má pozitivní účinky na léčbu poškození paměti a Alzheimerovy choroby. Mechanismus účinku spočívá ve snížení poměru p25/p35, redukuje fosforylaci tau proteinu. Dokáže také vylepšovat kognitivní funkce a má neuroprotektivní vlastnosti. [18]

Vodný extrakt houtunie inhibuje sloučeninu 48/80, která je zodpovědná za degranulaci mastocytů, čímž působí proti vyvolání anafylaxe. [19]

Bylo prokázáno, že vodný extrakt dokáže snížit hladinu triacylglycerolů a celkového cholesterolu a zároveň redukuje množství celkového tělesného tuku. Celkově působí proti dyslipidémii a snižuje aterogenní riziko. [20]

Ethanolický extrakt z endofytní houby (kmen 28, identifikován jako *Chaetomium globosum*) izolované z *H. cordata*, má široké spektrum antifungálních účinků. Dokáže inhibovat 15 druhů patogenetických hub. [21]

Ukázalo se, že esenciální olej, vodný i ethanolický extrakt z *H. cordata* má protizánětlivý účinek, a to díky obsahu flavonoidů. Mechanismus účinku spočívá v inhibici prozánětlivých cytokinů (IL-6) a produkci NO. Dále má schopnost snižovat permeabilitu kapilár a inhibovat C reaktivní protein. [16][22]

H. cordata je bohatým zdrojem polyfenolů, zejména flavonoidů. Vodný extrakt obsahuje větší množství polyfenolů než methanolvý. Díky těmto látkám působí antioxidačně a má také antimutagenní účinky. [23]

Bylo zjištěno, že *H. cordata* má také antivirotické účinky. Působí zejména proti viru influenzy, herpes simplex viru, viru HIV a SARS koronaviru. Pára vznikající při destilaci rostliny dokáže inaktivovat obalené viry, avšak na neobalené vliv už nemá. Bylo prokázáno, že zejména hyperosid získaný z extraktu z *H. cordata* vykazuje účinek proti

viru dengue, jelikož má inhibiční účinek na uvolňování virionů, a tudíž dojde k inaktivaci viru ještě před infekcí buňky. ^{[17][24]}

H. cordata má inhibiční efekt na rozvoj atopie. Dokáže totiž zesílit kožní bariéru a snížit hladinu IgE. Snižuje také hladinu IL-4, který je zodpovědný za produkci IgE. Dále zvyšuje hladinu IFN γ , který působí na snížení produkce IgE a IL-4. ^[25]

Dále se ukázalo, že fenylethanové glykosidy izolované z *H. cordata* mají hepatoprotektivní účinky. ^[26]

Při hledání nového způsobu léčby herpes simplex viru se extrakt z *H. cordata* jeví jako potenciální možnost. Její vodný extrakt dokáže inhibovat infekci HSV-1 a HSV-2 blokáci vazby a penetrace viru na počátku infekce. Zastavuje také replikaci viru. ^[27]

Laurylaldehyd a dekanolaldehyd (houttuynin), obsažené v esenciálním oleji, působí antimikrobiálně proti gram-pozitivním bakteriím a mají antifungální účinky. ^[28]

Dále dokáže *H. cordata* odstraňovat mechanicky i termálně vyvolanou hyperalgesii, ovlivněním NADPH oxidasy zmírňuje diabetem vyvolané srdeční a ledvinné oxidační poškození, moduluje produkci antimikrobiálních proteinů a cytokinů, čímž podporuje vrozenou slizniční imunitu v ženském reprodukčním traktu. ^{[29][30][31]}

3.1.2.6 Toxicita

Po provedení Amesova testu nebyly nalezeny žádné mutace. Test chromozomových aberací neprokázal statisticky významné riziko vzniku mutací. ^[32]

Testy akutní a chronické toxicity na myších neprokázaly negativní účinky na testované organismy. Díky tomu se může užívání extraktu *H. cordata* považovat za bezpečné. ^[79]

3.1.3 *Paeonia lactiflora*

3.1.3.1 Botanický popis rostliny a zařazení

Říše: Rostliny (*Plantae*)

Oddělení: Krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: Vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

Řád: Lomikamenotvaré (*Saxifragales*)

Čeleď: Pivoňkovité (*Paeoniaceae*)

Rod: Pivoňka (*Paeonia*)

Český název rostliny je pivoňka bělokvětá a patří do čeledi pivoňkovité, latinsky *Paeoniaceae*. Jedná se o vytrvalou bylinu, která dosahuje výšky 0,6 – 1 metru. Listy má velké, lesklé, kožovité, celokrajné, řapíkaté a dvakrát trojčetné. Květ se skládá z 8 korunních lístků bílé nebo růžové barvy. Plodem je měchýřek, který obsahuje velká hnědá semena. ^{[38][45]}



Obrázek 7: *Paeonia lactiflora* © ^[36]

3.1.3.2 Výskyt

Vyskytuje se na stráních a okrajích lesů. Původem je z Číny, Japonska, Mongolska, Sibiře a Dálného východu. Je také oblíbenou okrasnou rostlinou, která je často pěstována na zahradách. ^[38]

3.1.3.3 Popis drogy

TČM využívá kořen rostliny (*Paeoniae radix alba*) a tradičně ji nazývá Baishao. Kořeny se sklízí v létě a na podzim. Odstraní se z nich hlava, špička a boční kořínky a

nechají se povařit. Poté se odstraní svrchní vrstva kůry, vše se nařeže na plátky a usuší se. ^[8]

Usušená droga je tvořená podélnými plátky bílé barvy, které jsou hladké a tvrdé. Vůni má jen slabou, chuť nahořklou a kyselou. ^[8]

Tabulka 3: Produkty obsahující *Paeoniae radix alba* ^{[40][41][42][43]}

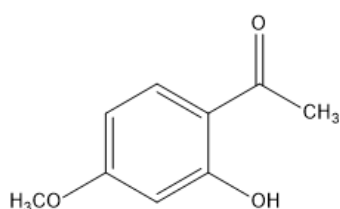
	Český název	Výrobce	Indikace
Xiao Qing Long Pian	Pilulka tyrkysového draka	TCM Bohemia s.r.o.	Nachlazení se zimomřivostí, kašlem, zahleněním, dušnost při infekci
Nuan Gong Yun Zi Wan	Zvelebení rumělkového pole	TCM Bohemia s.r.o.	Neplodnost, poruchy cyklu, bolestivá menstruace
Dang Gui Shao Yao Wan	Růst hory Tchaj	TCM Bohemia s.r.o.	Podpora těhotenství, těhotenské křeče, předčasné děložní stahy
Gui Zhi Tang Pian	Skořicovníková směs	TCM Bohemia s.r.o.	Počátky nachlazení, zimomřivost, pobolívání těla, snížená imunita



Obrázek 8: *Paeoniae radix alba* © ^[44]

3.1.3.4 Obsahové látky

Hlavní obsahové látky náleží do chemických skupin monoterpenoidů, triterpenů, flavonoidů, fenolů nebo taninů. Typickou obsahovou látkou pro tuto rostlinu je monoterpenický glykosid paeoniflorin. Dále obsahuje pentagalloylglukosu, kyselinu gallovou, albiflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, paeonol, β -sitosterol, daucosterol, katechin, kyselinu benzoovou aj. Obsah paeonolu je nejasný. Některé studie prokázaly jeho výskyt v rostlině, jiné zase přišly s výsledkem, že je jeho množství nedetekovatelně nízké. ^{[33][38]}



Obrázek 9: Paeonol

3.1.3.5 Biologické účinky a použití

Významnou vlastností *P. lactiflora* je její protizánětlivá a imunomodulační aktivita. Ta je způsobena zejména obsahem monoterpenických glykosidů. Dále mají také schopnost snižovat projevy revmatoidní artritidy. Dokáže také snižovat celkový cholesterol, triglyceridy a LDL cholesterol a inhibuje expresi prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6 a CRP. Má tedy terapeutický potenciál v léčbě aterosklerózy. Může mít také pozitivní účinky při léčbě neurodegenerativních chorob, např. Alzheimerovy choroby, a to díky protizánětlivé aktivitě v gliových buňkách. ^[33]

Obsahové látky paeonol, paeoniflorin a 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucosa mají protialergické účinky. Mechanismus účinku je dán inhibicí tvorby IgE. Další monoterpeny a flavonoidy tento účinek ještě podporují. ^{[33][34]}

Daucosterol a β -sitosterol mají potenciál v léčbě benigní hyperplazie prostaty. Tannin pedunculagin snižuje tloušťku a drsnost pokožky. ^[33]

P. lactiflora se ukázala jako potenciální možnost v léčbě nádorů. Mechanismus účinku spočívá v upregulaci apoptózy, dokáže také ovlivnit angiogenezi, růst tumoru a tvorbu metastáz. Studie také prokázaly, že dokáže senzitivizovat cílové buňky k chemoterapii. [33]

P. lactiflora má antivirotické účinky. Dokáže inhibovat syntézu nebo replikaci virů. Pentagalloylglukosa může být použita pro terapii influenzy A, hepatitidy B a C a herpes simplex viru. Kyselina gallová redukuje replikaci viru HIV. [33]

Tellimagradin I dokáže snižovat rezistenci k antibiotikům a zvyšuje účinnost antibiotik. Kyselina benzoová se používá jako konzervans pro své antifungální účinky. [33]

Monoterpenický glykosid albiflorin vykazuje antioxidační aktivitu stejně jako kyselina gallová nebo monoterpen paeonilacton C. [33]

Obsahové látky z *P. lactiflora* mají potenciál při léčbě diabetu. Paeonol dokáže inhibovat uptake glukosy a kyselina gallová snižuje hladinu glukosy v krvi. Paeoniflorin a 8-debenzoylpaeoniflorin dokáží snižovat hladinu cukru v krvi. [33][35]

3.1.3.6 Toxicita

P. lactiflora je považována za netoxickou. Kyselinu benzoovou zařadila FDA mezi bezpečné látky. Ve vyšších dávkách můžou být pyrethrin I a fenol toxické. [33]

3.1.4 *Psoralea corylifolia*

3.1.4.1 Botanický popis rostliny a zařazení

Říše: Rostliny (*Plantae*)

Oddělení: Kryptosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: Vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

Řád: Bobotvaré (*Fabales*)

Čeleď: Bobovité (*Fabaceae*)

Rod: *Cullen*

Český název rostliny je dětelník lískolistý a patří do čeledi bobovité, latinsky *Fabaceae*. Jedná se o jednoletou bylinu, která dorůstá výšky 0,6 – 1,2 metru. Stonek i

větve jsou rýhované a žláznaté. Listy vyrůstají střídavě, čepel je oválná až srdčitá, z obou stran porostlá chloupky a okraj je pilovitý. Modré květy vyrůstají po deseti až třiceti v hustých úžlabních hroznech. Plodem je nepukavý lusk, který obsahuje jedno ploché tmavě hnědé semeno. [38][46]



Obrázek 10: *Psoralea corylifolia* © [47]

3.1.4.2 Výskyt

V Indii se vyskytuje jako plevel po celém území. V Číně roste nejvíce na severu a jihovýchodě, zejména v tropických a subtropických oblastech. [38][55]

3.1.4.3 Popis drogy

TČM využívá plod rostliny (*Psoraleae fructus*) a drogu nazývá Buguzhi. Na podzim se z rostliny sbírají klásky se zralými semeny, suší se na slunci a poté se z nich vytřepou semena. [8]

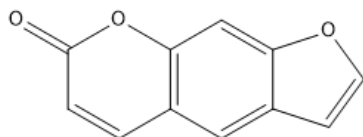
Sušená droga je tvořená semeny, která jsou oválná a mají hnědočernou barvu. Jsou aromatická a mají mírně štiplavou až hořkou chuť. [8]



Obrázek 11: *Psoraleae fructus* © ^[48]

3.1.4.4 Obsahové látky

Plody jsou bohaté na psoralen, isopsoralen, psoralidin, bavachin, isobavachin, bavachinin, bavachalkon, isobavachalkon, bakuchiol aj. ^[38]



Obrázek 12: Psoralen

3.1.4.5 Biologické účinky a použití

Ethanolický extrakt inhibuje růst tumoru. Má také cytotoxické účinky vůči buňkám karcinomu žaludku, konečníku a prsu. Jeho protirakovinný účinek je podpořen schopností downregulace cyklinu D1 a CDK4, které se podílejí na řízení buněčného dělení. ^[49]

Obsahová látka bavachin může nalézt potencionální využití v léčbě diabetu 2. typu, protože urychluje uptake glukosy přes GLUT-4, čímž snižuje hladinu glukosy v krvi. Dále zvyšuje hladinu insulinu v plasmě a snižuje celkový cholesterol v plasmě. Obsah vápníku a hořčíku v extraktu působí synergicky při snižování hladiny glukosy a lipidů. ^{[50][51]}

Obsahová látka bakuchiol působí proti viru influenzy A a to tak, že redukuje expresi virové mRNA a proteinů. [52]

Díky svojí schopnosti působit proti zánětu v mozku by mohl mít potenciální využití v léčbě Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby a dalším demencím. [53]

U několika obsahových látek byl prokázán estrogenní účinek. Dokáží také významně inhibovat aktivitu volných radikálů. Podílí se i na ochraně mitochondriálních funkcí před účinky volných radikálů. [55]

Bakuchiol by mohl být využit při předcházení zubních kazů, jelikož má antimikrobiální účinky proti některým orálním mikroorganismům. Mnoho dalších obsahových látek prokázalo antibakteriální aktivity, například proti *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium aurum* nebo *Helicobacter pylori*. Navíc byly dokázány i antifungální účinky těchto látek. Další významnou vlastností je protizánětlivý účinek zejména bavachininu a bakuchiolu. Zmenšují edém a snižují aktivitu myeloperoxidasy, redukují hladinu PGE₂ a kyseliny arachidonové a kontrolují migraci a degranulaci leukocytů. [55]

Furanokumariny jako psoralen a psoralidin jsou hlavními složkami zodpovědné za antidepresivní účinky. Mechanismus účinku spočívá v inhibici MAO. Bakuchiol dokáže regulovat sekreci katecholaminů. Bavachin, isobavachin a bakuchiol podporují proliferaci a diferenciaci osteoblastů, a tudíž by mohly být využitelné při léčbě osteoporózy. Dále jsou těmto obsahovým látkám také přisuzovány hepatoprotektivní účinky. [55]

3.1.4.6 Toxicita

U vyšších dávek psoralenu a isopsoralenu se při testování na potkanech objevily tyto nežádoucí vedlejší účinky: snížená aktivita, krvácení, snižování tělesné hmotnosti a snižování chuti k jídlu. [56]

3.1.5 *Typha orientalis*

3.1.5.1 Botanický popis rostliny a zařazení

Říše: Rostliny (*Plantae*)

Oddělení: Krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: Jednoděložné (*Liliopsida*)

Řád: Lipnicotvaré (*Poales*)

Čeleď: Orobincovité (*Typhaceae*)

Rod: Orobinec (*Typha*)

Český název rostliny je orobinec a patří do čeledi orobincovité, latinsky *Typhaceae*. Je to vytrvalá bylina dorůstající výšky 1 – 3 metry s mohutnými, plazivými a rozvětvenými oddenky. Listy má dlouhé, úzké, dvouřadě uspořádané se souběžnou žilnatinou. Květenství je složené ze dvou válcovitých palic. Horní je složená ze samčích květů, dolní ze samičích. Květy jsou drobné a nemají květní obaly. Plodem je nažka, která je na dlouhé stopce s létajícím aparátem tvořeným chlupy okvětí. [38][57]



Obrázek 13: *Typha orientalis* © [37]

3.1.5.2 Výskyt

Tato rostlina se vyskytuje zejména na březích stojatých vodních ploch nebo v deltách řek. Roste v mírném pásu Evropy, Asie, Austrálie, Severní Ameriky a na severu Afriky. [38]

3.1.5.3 Popis drogy

TČM využívá pyl z této rostliny (*Typhae pollen*) a drogu tradičně nazývá Puhuang. Droga se získává v létě, kdy se odřezávají klásky se samčími květními úbory. Suší se na slunci a poté se z nich vytřeše pyl. [8]

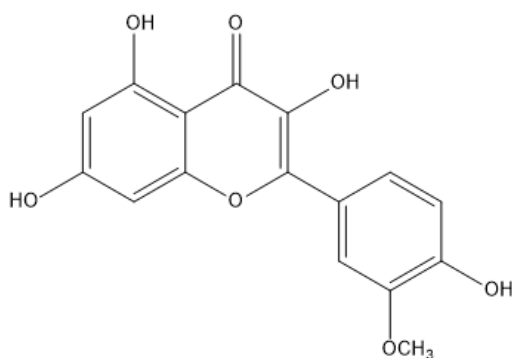
Sušenou drogu tvoří pylový prach, který je jasně žluté barvy a má hladký povrch. Chuť má sladkou. [8]



Obrázek 14: *Typhae pollen* © [61]

3.1.5.4 Obsahové látky

Pyl obsahuje zejména flavonoidní látky, konkrétně isorhamnetin, katechin, typhaneosid, astragalin, naringen a kempferol. Dále obsahuje pentacosan, α -sitosterol, α -typhasterol, kyselinu palmitovou, aspartamovou, glutamovou, alanin, serin, lysin, histidin aj. Obsahuje také minerální látky jako zinek, měď, mangan, železo, hořčík a draslík. [38][39]



Obrázek 15: Isorhamnetin

3.1.5.5 Biologické účinky a použití

Extrakt z drogy *Typhae pollen* podporuje vychytávání glukosy, což způsobuje jeho účinky proti inzulínové rezistenci. [58]

Ethanolický extrakt má imunosupresivní účinky. Inhibuje totiž aktivitu T a B lymfocytů a mohl by nalézt uplatnění při předcházení rejekce štěpu. [59]

Díky obsahu množství flavonoidních látek má droga účinky protizánětlivé, antioxidační a antikoagulační. Dokáže také tišit bolest. [39]

3.2 Biologická aktivita

Biologickou aktivitu je možné definovat jako proces, při kterém je ovlivňována nebo měněna nějaká biologická reakce v živém organismu. To se děje na základě interakce určité molekuly s cílovou strukturou, která pro vyvolání specifického účinku potřebuje jisté strukturní prvky a koncentraci dané látky. Cílovou strukturou může být receptor, iontový kanál, enzym, transportní systém nebo jiná struktura. Je časté, že jedna molekula dokáže vyvolat více různých účinků a také, že pro určitý účinek je potřeba působení více molekul. [62]

3.3 Testy toxicity

Toxicitu je v laboratorních podmínkách možné definovat jako následek působení určité látky na testovací systém, který je chápán jako nepříznivý. Mají na ni vliv různé faktory. Mezi nejdůležitější se řadí koncentrace dané sloučeniny a expozice neboli doba, po kterou je testovací organismus vystaven zkoumané látce. Test toxicity se dá vysvětlit

jako sledování odpovědi organismu na zkoumanou látku o určité známé koncentraci za definovaných podmínek. Paralelně probíhá i kontrolní testování. Zkoušená látka je většinou testovanému organismu podávána ve vodném roztoku. Proto je potřeba, aby, pokud se jedná o pevnou látku, byla rozpustná ve vodě. Pro kapalně látky je podmínkou jejich mísitelnost s vodou. Podle délky expozice se testy toxicity dělí na akutní, subchronické a chronické. Při akutních testech toxicity je doba expozice 4 – 24 hodin a získává se zde nejčastěji hodnota LD₅₀. U subchronických testů je to několik týdnů až 4 měsíce a u chronických půl roku až několik let. V průběhu je testovaným organismům odebírána moč a krev. Dále se sledují změny chování, aktivity, chuti k jídlu nebo změny hmotnosti. Provádí se také pitva pro sledování histologických změn orgánů. [63]

In vitro testování je nejčastější a nejvýhodnější způsob testování. Probíhá na zjednodušených modelech (buněčné, tkáňové systémy, izolované orgány) nebo na nižších organismech. *In vivo* testování probíhá na živých zvířatech. Subchronické *in vivo* testy slouží k posuzování bezpečnosti léčiv, potravních aditiv nebo pesticidů. Zjišťovanými hodnotami jsou NOAEL (no observed adverse effect level), což je dávka, při které ještě nebyl pozorován žádný účinek a LOAEL (the lowest observed adverse effect level), což je nejnižší dávka, kdy byl pozorován nějaký účinek. Třetí možností je provedení testů *in silico*, které se realizuje pomocí počítačové simulace a tedy nejsou použity živé organismy. [64]

Díky skutečnosti, že je testování *in vivo* finančně nákladné, zdlouhavé a vnímané jako eticky nekorektní, jsou v poslední době vyvíjeny alternativní metody, které by tyto problémy vyřešily. Jisté metody jsou schopny redukovat jak finanční a časové náklady, tak i potřebu a utrpení zvířat. Byl zaveden koncept 3R, který má za úkol replacement = aby testy neprobíhaly na zvířatech, reduction = snížení počtu pokusných zvířat, refinement = aby zvířata při testování trpěla co nejméně. Z těchto důvodů se v moderní toxikologii čím dál častěji využívají *in vitro* testy na zjednodušených modelech nebo s nižšími organismy. [65]

V toxikologii se pomocí toxikologických testů získávají tyto hodnoty:

- LD₅₀ (median lethal dose): Je to množství sledované látky, které zapříčiní smrt 50 % testovaných organismů za definovaných podmínek v porovnání s kontrolním organismem. Tato dávka je běžně uváděna v mg/kg. [66]

- LC₅₀ (median lethal concentration): Je to koncentrace sledované látky, při které dojde k usmrcení 50 % testovaných organismů za definovaných podmínek v porovnání s kontrolním organismem. Tato dávka je běžně uváděna v ppm nebo mg/m³. [67]
- TD₅₀ (median toxic dose): Je to dávka vyžadující 50% odpověď testované populace na specifický toxický účinek. [70]
- LOAEL (lowest observed adverse effect level): Je to nejnižší koncentrace nebo množství látky získané pomocí experimentu, které je příčinou nežádoucí změny morfologie, funkce, růstu, vývoje nebo délky života cílového organismu za definovaných podmínek v porovnání s kontrolním organismem. [68]
- NOAEL (no observed adverse effect level): Je to nejvyšší koncentrace nebo množství látky zjištěné pomocí experimentu, kdy ještě nedochází ke změně morfologie, funkce, růstu, vývoje nebo délky života cílového organismu za definovaných podmínek v porovnání s kontrolním organismem. [69]
- ED₅₀ (median effective dose): Je to dávka potřebná k vyvolání určitého účinku v 50 % sledované populace. [70]
- EC₅₀ (half maximum effective concentration): Je to koncentrace, při které je pozorováno, že v 50 % nastane požadovaný účinek. [70]

Dalšími možnými organismy pro testování toxicity jsou *Daphnia magna*, *Tetrahymena thermophila*. [71]

3.3.1 OECD Guidelines pro testování chemických látek

V roce 1981 OECD vypracovala podmínky pro testování chemických látek s cílem zvýšit platnost a mezinárodní uznávání testovaných dat a zabránit zbytečnému používání laboratorních zvířat. Zahrnují testy fyzikálně-chemických vlastností, ekotoxické testy, testy toxicity a další jako například testování pesticidů. Aby mohly být provedené testy mezinárodně uznané, musí se řídit podmínkami stanovenými OECD. [72]

3.4 Testování toxicity na *Artemia salina*

V našem experimentu byl použit akutní test toxicity za použití *Artemia salina* jako testovaného organismu. Tímto testem se stanovuje procento uhynulých nauplií v závislosti na koncentraci stanovované látky. Jako endpoint je možno získat například hodnotu LC₅₀, LD₅₀, EC₅₀, NOAEL, LOAEL.

Vajíčka artémií jsou u nás k dispozici v konzervách a ve většině případů pocházejí z USA z Velkého solného jezera v Utahu. Žijí ve stojatých vodách s mírně až velmi slanou vodou. Díky svojí vysoké adaptibilitě na různé životní podmínky jsou dosti rozšířenými organismy a žijí i na místech, kde jiné organismy přežít nedokáží. ^[60]

Pro testování se využívají nauplia artémií, což jsou čerstvě vylíhnutí jedinci, kteří bez krmení vydrží 96 – 120 hodin. Testování probíhá ve většině případů v intervalu 24 hodin, z čehož vyplývá, že nauplia není potřeba krmit. Další výhodou je rychlost testování, téměř 100% líhnivost vajíček, nízká cena, lehká manipulace, nenáročnost na laboratorní podmínky a dobré znalosti biologie artémií. ^[60]

Laboratorní líhnutí vajíček probíhá v uměle vytvořené mořské vodě o salinitě 1,2 – 3,0 ‰ NaCl. Provzdušňování vody kyslíkem je zabezpečeno slabým proudem vzduchu se záměrem, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku byla 6,5 mg/l a pH roztoku by ideálně mělo mít hodnotu 8,0 ± 0,1. Optimální teplota k líhnutí je 27 – 29 °C, kdy líhnutí trvá přibližně 18 hodin. Častěji se využívá teplota 25 °C, při které se líhnutí prodlouží na 24 hodin, což je pro laboratorní podmínky výhodnější. Odlov vylíhnutých žábřonožek je usnadňován bodovým osvětlením, jelikož jsou ke světlu přitahovány. ^[60]

Organismus *Artemia salina* je s výhodami užíván nejen při testování toxicity, ale také v ekotoxikologii. ^{[71][79]}

3.4.1 *Artemia salina*

Říše: Živočichové (*Animalia*)

Oddělení: *Triblastica*

Kmen: Členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: Korýši (*Crustacea*)

Třída: Lupenonožci (*Branchiopoda*)

Řád: Žábřonožky (*Anostraca*)

Čeleď: Žábronožkovití (*Artemiidae*)

Rod: Žábronožka (*Artemia*)

Artemia salina dorůstá délky 12 – 18 mm a dožívá se 4 měsíců. Tělo má protáhlé, článkované a bez schránky. Na hlavě vyrůstají dva páry tykadel. Na spodní straně hlavy je ústní ústrojí a na čele se nachází jedno nepárové naupliové očko. Na bocích hlavy jsou složené oči. Hrudní část je složena z jedenácti článků a z každého vyrůstá jeden pár plovacích nožek. Zadeček je složen z devíti článků. Nachází se zde rozmnožovací ústrojí, u samic také vak s vajíčky. ^{[60][73][74][75]}



Obrázek 16: *Artemia salina* © ^[76]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a vybavení

Přístroje

K experimentu byly použity tyto přístroje:

- Analytické digitální váhy KERN ABJ
- Ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITAL 10P BANDELIN
- Třepačka VORTEX-GENIE 2
- Mikroskop LEICA EZ4D
- Vakuová pumpa
- Vakuová odparka
- Vakuový exsikátor

Pomůcky

K experimentu byly použity tyto pomůcky:

- Váženky, lžičky, třecí miska, tlouček
- Destilační baňky, vodní chladič, vodní lázeň, kádinky
- Vliselinový filtr, filtrační tubus, křemelina
- Malé zkumavky
- 96jamková mikrotitrační destička typ Fischer Brandt
- Mikropipeta
- Petriho miska
- Lupa

Chemikálie

K experimentu byly použity tyto chemikálie:

- Ethanol (Penta)
- NaCl (Penta)
- $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Penta)

- $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$ (Penta)
- CaCl_2 (Penta)
- KCl (Penta)
- Deionizovaná voda

4.2 Příprava extraktů

Použité drogy byly získány od firmy PRAGON s.r.o. Suchá rostlinná část byla rozlámána a rozemleta na prášek v mixéru. Bylo naváženo 5 – 10 gramů tohoto práškového materiálu. Odměřené množství vody (na 1 g materiálu bylo potřeba 15 ml vody) se zahřálo na vařiči na teplotu 80 – 90 °C. Poté se jím přelilo odvážené množství rostlinného materiálu v destilační baňce a pod vodním chladičem se zahřívalo na vroucí vodní lázni 15 minut. Extrakt byl přefiltrován přes vliselinový filtr. Matolína na dně baňky byla opět přelita odměřeným množstvím vody zahřáté na 80 – 90 °C a proces byl zopakován. Spojené filtráty zahřáté na teplotu 80 °C byly zfiltrány přes filtrační tubus se slabou vrstvou neutrální křemeliny a roztok se nechal odpařit ve vakuové odparce při teplotě 60 °C za sníženého tlaku. Baňka s odparkem se umístila do vakuového exsikátoru. Nakonec byl extrakt pomocí tekutého dusíku homogenizován a převeden na prášek. Získaná množství jednotlivých extraktů jsou uvedena v tabulce 4.

Tabulka 4: Hmotnosti a výtěžek extraktů

	Hmotnost drogy [g]	Hmotnost extraktu [g]	Výtěžek [%]
<i>Houttuyniae herba</i>	9	1,7784	19,76
<i>Magnoliae officinalis cortex</i>	9	0,6733	7,48
<i>Psoraleae fructus</i>	9	2,2063	24,51
<i>Typhae pollen</i>	10	1,7356	17,36
<i>Paeoniae radix alba</i>	8	1,8936	23,67

4.3 Provedení testu biologické aktivity

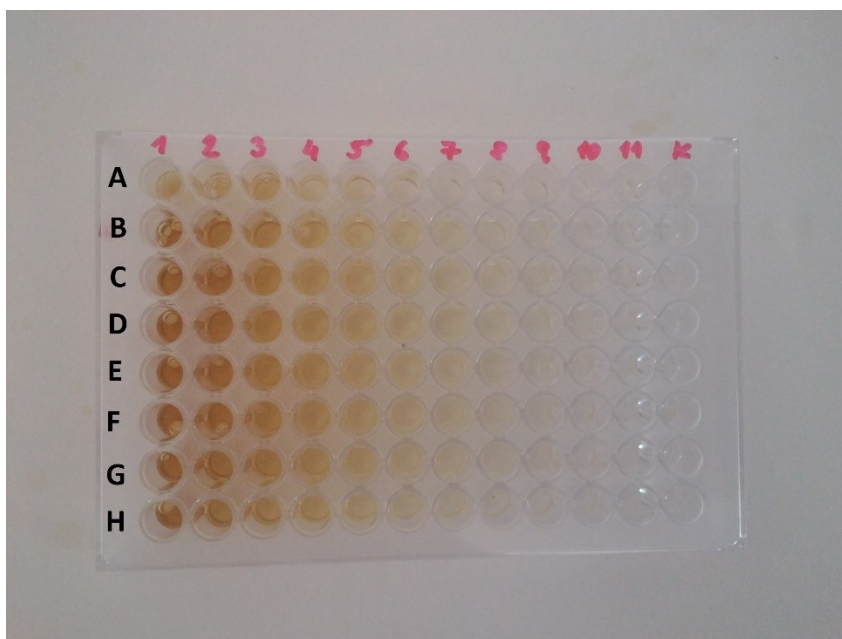
Před provedením testu bylo potřeba nechat vylíhnout vajíčka artémii. Použitá vajíčka byla získána z produktu Artemia Eggs Profi od firmy Dajana. Líhnutí probíhalo

v mořské vodě při teplotě 25 ± 2 °C po dobu 24 hodin v inkubátoru. Po celou dobu byla ozařována světlem a provzdušňována slabým proudem vzduchu tak, aby cysty nezůstávaly ležet na dně nebo na hladině. Složení mořské vody je popsáno v níže uvedené tabulce 5. Koncentrace rozpuštěného kyslíku v mořské vodě byla 6,5 mg/l a hodnota pH $8,0 \pm 0,1$.

Tabulka 5: Složení laboratorní mořské vody

Chemikálie	Hmotnost [g]
NaCl	23,0
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	11,0
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$	9,07
CaCl_2	2,11
KCl	0,7
H_2O	do 1000

Samotný test toxicity probíhal v 96jamkové mikrotitrační destičce. Z každého rostlinného extraktu bylo nejdříve nutné připravit roztoky požadované koncentrace. Jelikož jsou tyto extrakty špatně rozpustné v mořské vodě, bylo jejich rozpouštění prováděno v ultrazvukové lázni pro zlepšení podmínek rozpouštění. Ředění probíhalo v poměru 2:1 a to tak, že do první zkušavky bylo napipetováno 2400 µl roztoku, do druhé až jedenácté 800 µl mořské vody. Z první pak bylo odebráno 1600 µl, které byly přidány do druhé zkušavky. Ta se protřepala, odebralo se z ní 1600 µl a přidalo do třetí. Stejně se postupovalo u dalších zkušavek. Do prvních jedenácti sloupců se napipetovala dělicí řada roztoku a to tak, že se do každé jamky dalo 100 µl příslušné koncentrace. Řada A sloužila jako promývací a samotné stanovení probíhalo v řadě B – H. Dvanáctý sloupec sloužil jako negativní kontrola a každá jamka obsahovala 100 µl samotné mořské vody. Do každé jamky včetně kontroly bylo přes promývací jamky napipetováno ideálně 10 nauplií o stáří 24 hodin. Destička s víčkem byla vložena na 24 hodin do inkubátoru, který byl nastaven na 25 °C. ^[60]



Obrázek 17: Mikrotitrační destička (foto autor)

4.4 Vyhodnocení

Testy byly vyhodnocovány po 24 hodinách. Spočítalo se, kolik nauplií zůstalo živých. Ta se poznala tak, že po poklepání na destičku se rozplavala. Mrtvá zůstala ležet na dně jamky. Testování každého vzorku proběhlo třikrát.

5 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

Každá droga byla otestována třikrát. Naměřené mortality jsou uvedené v tabulkách 6, 8, 10, 12 jako průměry ze tří měření.

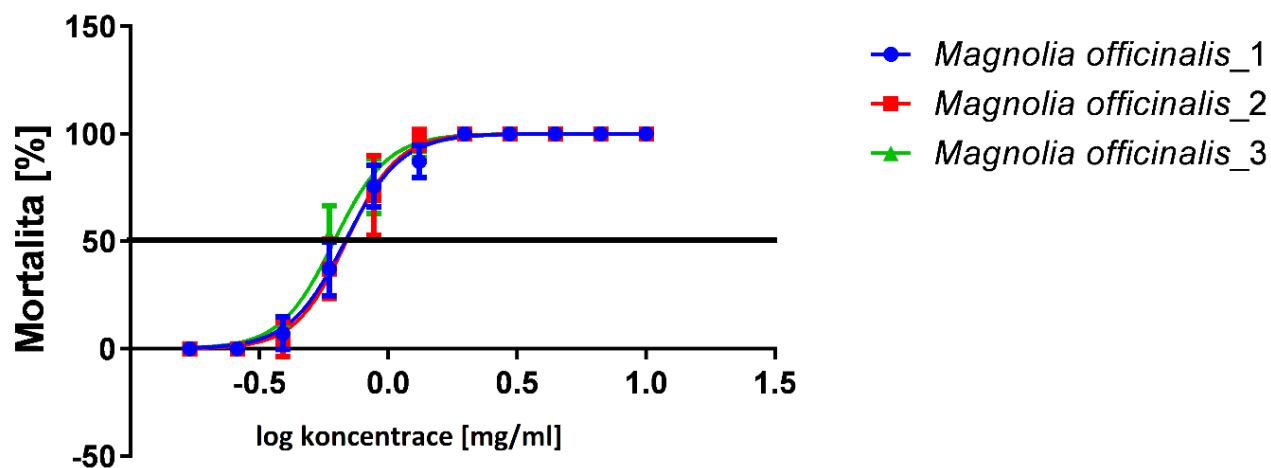
V programu GraphPad Prism 6 byly spočítány hodnoty středních letálních koncentrací v závislosti mortality artémií na koncentracích jednotlivých drog.

U drogy *Paeoniae radix alba* byla i při nejvyšší měřené koncentraci, což bylo 15 mg/ml, naměřena nulová mortalita artémií. Z tohoto údaje vyplívá, že i toxicita této drogy je v měřeném rozmezí koncentrací nulová.

5.1 *Magnolia officinalis*

Tabulka 6: Naměřené mortality extraktu *Magnoliae officinalis cortex* (průměr ze 3 měření)

Koncentrace [mg/ml]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Průměr mortalit [%]
10,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
6,67	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
4,44	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
2,96	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1,98	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1,32	90,00	86,67	100,00	96,67	93,33	90,00	93,33	92,86
0,88	86,67	83,33	70,00	70,00	73,33	66,67	70,00	74,29
0,59	50,00	50,00	46,67	50,00	26,67	36,67	36,67	42,38
0,39	0	6,67	3,33	6,67	0	16,67	6,67	5,71
0,26	0	0	0	0	0	0	0	0
0,17	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0



Obrázek 18: Závislost mortality artémií na koncentraci extraktu *Magnoliae officinalis cortex*

Tabulka 7: Hodnoty LC_{50} extraktu *Magnoliae officinalis cortex*

	LC_{50}
Test 1	0,6805
Test 2	0,6875
Test 3	0,6161
Průměr	0,6613

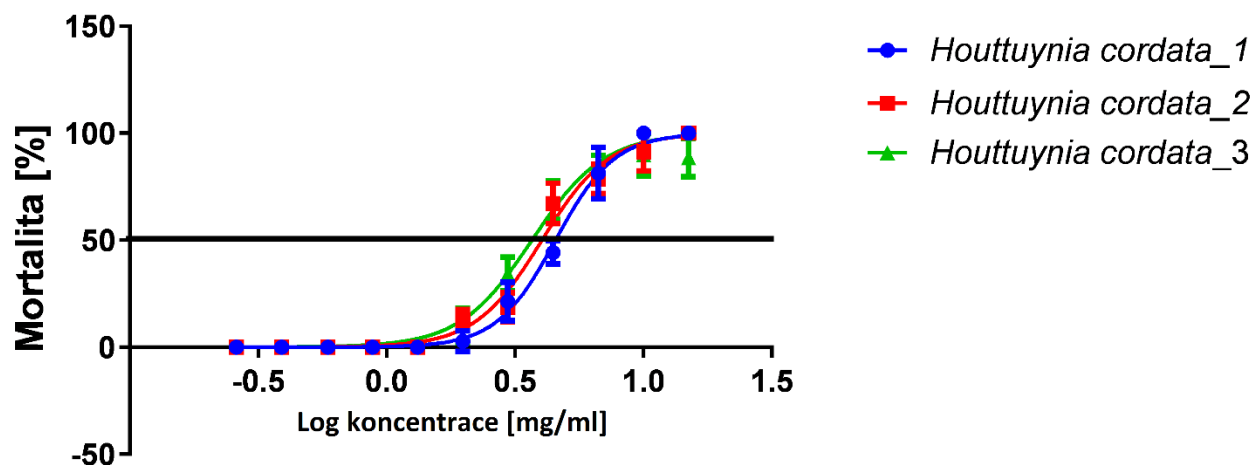
Hodnota střední letální koncentrace extraktu *Magnoliae officinalis cortex* je:

$$LC_{50} = 0,6613 \pm 0,0321 \text{ mg/ml}$$

5.2 *Houttuynia cordata*

Tabulka 8: Naměřené mortality extraktu *Houttuyniae herba* (průměr ze 3 měření)

Koncentrace [mg/ml]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Průměr mortalit [%]
15,00	96,67	93,33	93,33	100,00	100,00	93,33	96,67	96,19
10,00	96,67	90,00	93,33	96,67	100,00	93,33	86,67	93,80
6,67	83,33	83,33	86,67	83,33	80,00	76,67	76,67	81,43
4,44	56,67	66,67	60,00	53,33	53,33	60,00	70,00	60,00
2,96	16,67	23,33	26,67	33,33	26,67	23,33	23,33	24,76
1,98	3,33	6,67	13,33	10,00	13,33	6,67	6,67	8,57
1,32	0	0	0	0	0	0	0	0
0,88	0	0	0	0	0	0	0	0
0,59	0	0	0	0	0	0	0	0
0,39	0	0	0	0	0	0	0	0
0,26	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0



Obrázek 19: Závislost mortality artémií na koncentraci extraktu *Houttuyniae herba*

Tabulka 9: Hodnoty LC_{50} extraktu *Houttuyniae herba*

	LC_{50}
Test 1	4,540
Test 2	4,022
Test 3	3,676
Průměr	4,079

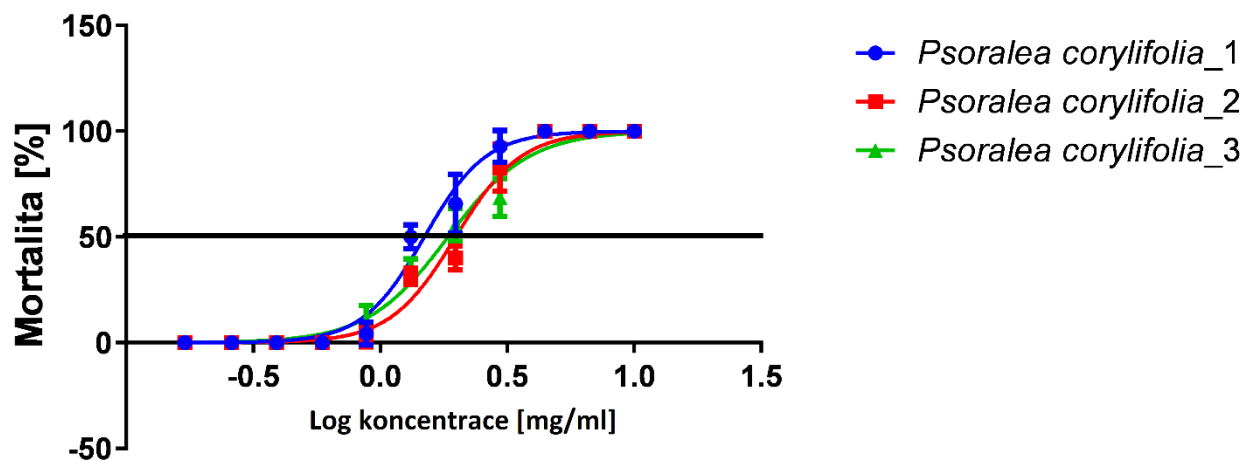
Hodnota střední letální koncentrace extraktu *Houttuyniae herba* je:

$$LC_{50} = 4,079 \pm 0,355 \text{ mg/ml}$$

5.3 *Psoralea corylifolia*

Tabulka 10: Naměřené mortality extraktu *Psoraleae fructus* (průměr ze 3 měření)

Koncentrace [mg/ml]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Průměr mortalit [%]
10,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
6,67	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
4,44	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
2,96	86,67	73,33	90,00	76,67	80,00	83,33	80,00	81,43
1,98	43,33	56,67	53,33	63,33	50,00	50,00	60,00	53,81
1,32	36,67	40,00	36,67	40,00	36,67	40,00	40,00	38,57
0,88	10,00	6,67	3,33	3,33	0	6,67	6,67	5,24
0,59	0	0	0	0	0	0	0	0
0,39	0	0	0	0	0	0	0	0
0,26	0	0	0	0	0	0	0	0
0,17	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0



Obrázek 20: Závislost mortality artémií na koncentraci extraktu *Psoraleae fructus*

Tabulka 11: Hodnoty LC₅₀ extraktu *Psoraleae fructus*

	LC ₅₀
Test 1	1,490
Test 2	1,979
Test 3	1,848
Průměr	1,777

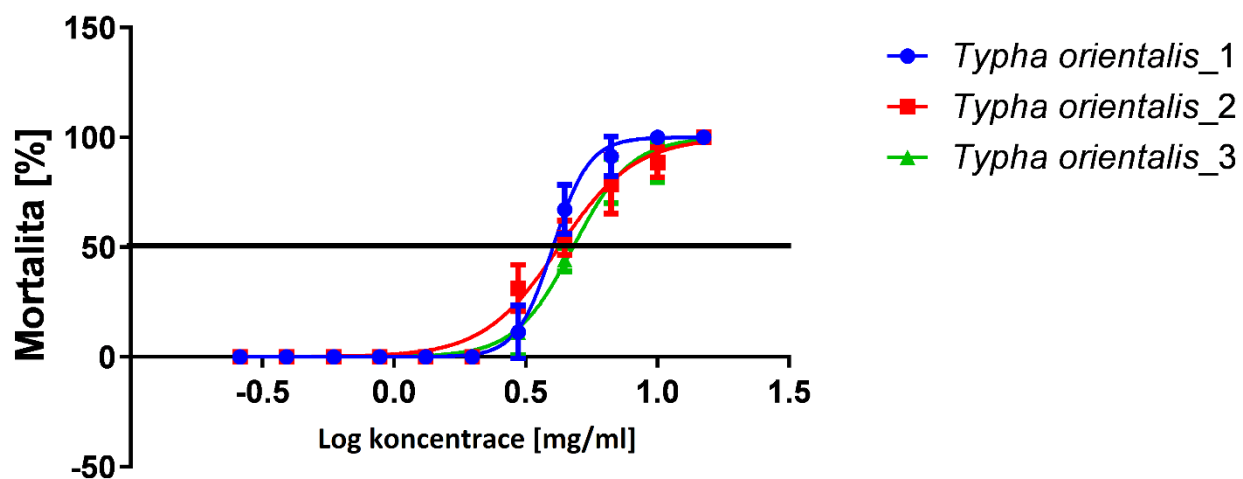
Hodnota střední letální koncentrace extraktu *Psoraleae fructus* je:

$$LC_{50} = 1,777 \pm 0,207 \text{ mg/ml}$$

5.4 *Typha orientalis*

Tabulka 12: Naměřené mortality extraktu *Typhae pollen* (průměr ze 3 měření)

Koncentrace [mg/ml]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Mortalita [%]	Průměr mortalit [%]
15,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
10,00	93,33	90,00	93,33	93,33	93,33	90,00	93,33	92,38
6,67	83,33	86,67	76,67	83,33	83,33	90,00	90,00	83,33
4,44	60,00	56,67	56,67	60,00	60,00	50,00	56,67	55,24
2,96	20,00	13,33	20,00	13,33	13,33	16,67	30,00	18,09
1,98	0	0	0	0	0	0	0	0
1,32	0	0	0	0	0	0	0	0
0,88	0	0	0	0	0	0	0	0
0,59	0	0	0	0	0	0	0	0
0,39	0	0	0	0	0	0	0	0
0,26	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0



Obrázek 21: Závislost mortality artémií na koncentraci extraktu *Typhae pollen*

Tabulka 13: Hodnoty LC_{50} extraktu *Typhae pollen*

	LC_{50}
Test 1	4,009
Test 2	4,230
Test 3	4,781
Průměr	4,340

Hodnota střední letální koncentrace extraktu *Typhae pollen* je:

$$LC_{50} = 4,340 \pm 0,325 \text{ mg/ml}$$

6 DISKUZE

Tato práce je věnována testování akutní toxicity pěti vybraných drog z tradiční čínské medicíny, které byly vyhodnoceny jako potenciálně vhodné pro léčbu řady různých onemocnění. Provedení těchto testů na modelových organismech je součástí preklinického testování. Slouží k určení, zda je bezpečné jeho podání člověku a k určení jeho iniciální dávky pro zkoušení na lidech.

Pro řadu výhod byla k testování vybrána nauplia *Artemia salina*. Mezi tyto výhody patří vysoká adaptabilita na různé koncentrace salinity a teplotu, krátký životní cyklus, nenáročnost na laboratorní podmínky, nízká cena, malá velikost těla a velká produkce vajíček. [60]

Existují však i názory hovořící proti užívání tohoto organismu. Důvodem je nízká senzitivita vůči chemickým látkám kvůli jejich extrémní odolnosti vůči vnějším podmínkám. Další nevýhodou je nutnost testování v mořské vodě, což je fyziologické prostředí artémií. Některé látky vykazují velmi špatnou rozpustnost v mořské vodě. [71]

Magnoliae officinalis cortex vykazuje spoustu blahodárných účinků na lidský organismus, zejména v centrální nervové soustavě a při léčbě rakoviny. Má schopnost zabraňovat rozvoji Alzheimerovy choroby, která je čím dál větším problémem a je tedy žádoucí nalézt účinnou látku proti této nemoci. [2]

Zhang Q. *et al.* studoval akutní toxicitu honokiolu na myších. Látka jim byla podávána intravenózně, přičemž jako LC_{50} byla zjištěna koncentrace 50,5 mg/kg. Ani testování chronické toxicity neprokázalo nijak významné nežádoucí účinky. Proto je možné honokiol prohlásit jako velmi bezpečnou látku. [77]

LD_{50} po perorálním podání *Magnoliae officinalis cortex* myším byla v další studii 51 g/kg a 8,5 g/kg po *i.p.* injekci. [78]

Dále byla studována mutagenita *Magnoliae officinalis cortex* pomocí organismu *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*, přičemž nebyly nalezeny žádné mutagenní vlastnosti. [2]

Obsahové látky z *Houttuyniae radix* se také jeví jako potenciálně využitelné při léčbě Alzheimerovy choroby. Dále snižují hladinu cholesterolu v krvi, čímž snižují aterosenní riziko. [18][20]

Při testování akutní a chronické toxicity *H. cordata* byl myším perorálně podáván její extrakt v narůstajících koncentracích. Nebyly pozorovány žádné histologické změny na orgánech ani ztráty hmotnosti nebo snížení aktivity. Nejvyšší podávaná dávka extraktu byla 2000 mg/kg. Byla tedy potvrzena velice nízká akutní a chronická toxicita po perorálním podání. [79]

Proti rozvoji Alzheimerovy choroby působí také *Paeoniae radix alba*. Dále má schopnost snižovat hladiny cukru a cholesterolu v krvi a má také významnou imunomodulační aktivitu. [33]

Data ohledně akutní a chronické toxicity drogy *Paeoniae radix alba* nejsou zatím v dostatečné míře k dispozici. Bude tedy ještě potřeba provést další testování před zhodnocením rozsahu její toxicity. Tato práce přispěla s údajem, že i při nejvyšší měřené koncentraci, což bylo 15 mg/ml, nevykazuje žádnou toxicitu.

Droga *Psoraleae fructus* vykazuje účinky proti rozvoji Alzheimerovy choroby. Její obsahové látky snižují hladinu cukru a cholesterolu v krvi. [50][51][53]

Skupina kolem Lu H. *et al.* testovala vedlejší účinky po podání psoralenu a isopsoralenu potkanům. Po jejich podání testovaným zvířatům se objevilo krvácení. Od 3. dne se v dávce 1600 µg/kg objevila otupělost, hypoaktivita a v dávce 2 mg/kg dále ještě ztráta tělesné hmotnosti a snížená chuť k jídlu. [56]

U *Typhae pollen* byl objeven účinek imunosupresivní, který může být využitelný při transplantacích proti rejekci štěpu. Dále má také schopnost snižovat hladinu cukru v krvi. [58][59]

Stejně tak data ohledně toxicity drogy *Typhae pollen* nejsou zatím dostupná. Tato práce vyhodnotila akutní toxicitu této drogy jako velmi nízkou a tedy bezpečnou pro podání člověku. Byla naměřena hodnota $LC_{50} = 4,340$ mg/ml. Pro lepší srovnání však bude ještě potřeba provést další testování.

7 ZÁVĚR

Cílem mojí diplomové práce bylo otestovat biologickou aktivitu pěti drog využívajících se v TČM. Konkrétně šlo o testování akutní toxicity. Mezi vybranými drogami byly *Magnoliae officinalis cortex*, *Houttuyniae herba*, *Paeoniae radix alba*, *Psoraleae fructus* a *Typhae pollen*. Tyto drogy mají vysoký potenciál k tomu, aby byly využívány i v západní medicíně.

Pro testování byl vybrán organismus *Artemia salina* a probíhalo v prostředí mořské vody. Z výsledků mortalit byly vypočítány hodnoty LC_{50} u jednotlivých drog, které posloužily jako výsledný endpoint.

U drogy *Paeoniae radix alba* byla i při nejvyšší koncentraci, což bylo 15 mg/ml, naměřena nulová mortalita artémií. Tento výsledek svědčí o nulové toxicitě drogy v testovaném rozmezí koncentrací. Dále byla nejméně toxickou drogou *Typhae pollen* s LC_{50} 4,340 mg/ml. Podobný výsledek byl naměřen i u *Houttuyniae herba*, která má LC_{50} 4,079 mg/ml. O něco vyšší toxicita byla naměřena u *Psoraleae fructus*, kde hodnota LC_{50} činila 1,777 mg/ml. Jako nejtoxičtější se ve vybrané pětici drog jevila *Magnoliae officinalis cortex*, u které byla naměřena hodnota LC_{50} 0,6612 mg/ml.

Tyto naměřené hodnoty svědčí o nízké toxicitě vybraných drog, a proto lze konstatovat, že je bezpečné testovat jejich užívání na lidské populaci.

8 ZDROJE

- [1] Janča J., Zentrich J. *Herbář léčivých rostlin 3 díl*. Praha: Eminent, 1995, 287. ISBN 80-85876-14-0.
- [2] Lee Y. J., Lee Y. M, Lee CH. K. *et al.* Therapeutic applications of compounds in the Magnolia family. *Pharmacology and Therapeutics*. 2011, **130**(2), 157-176. ISSN 01637258.
- [3] Biological Library. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id3182/>
- [4] Asianflora. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://www.asianflora.com/Magnoliaceae/Magnolia-officinalis-biloba.htm>
- [5] Tradiční čínská medicína. [online]. [cit. 2017-03-03]. Dostupné <https://www.cinskamedicina-vm.cz/www-cinskamedicina-vm-cz/eshop/0/3/5/39-UTISENI-VETRNE-BOURE-064>
- [6] Tradiční čínská medicína. [online]. [cit. 2017-03-03]. Dostupné <https://www.cinskamedicina-vm.cz/www-cinskamedicina-vm-cz/eshop/0/3/5/47-SPLACHNUTI-PECKY-SLIVONE-P081>
- [7] TCM Wiki. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://tcmwiki.com/wiki/hou-po>
- [8] Ando V. *Farmakologie klasické čínské medicíny*. Hradec Králové: Svítání, 2007, 1456. ISBN 978-80-86198-47-7.
- [9] Watanabe K., Watanabe H., Goto Y. *et al.* Pharmacological Properties of Magnolol and Honokiol Extracted from Magnolia officinalis: Central Depressant Effects. *Journal of Medicinal Plant Research*. 1983, **49**(2), 103-108. ISSN 0032-0943.
- [10] NC State University. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/all/houttuynia-cordata/>
- [11] Janča J., Zentrich J. *Herbář léčivých rostlin 6 díl*. Praha: Eminent, 1998, 279. ISBN 80-85876-45-0.
- [12] VitaMare. [online]. [cit. 2017-03-03]. Dostupné [https://www.zdravi-vitaminy-doplanky.cz/e-shop/byliny/T23%20-%20Vitani%20vune%20\(Welcome%20Fragrance\)%20\(tablety\)-detail](https://www.zdravi-vitaminy-doplanky.cz/e-shop/byliny/T23%20-%20Vitani%20vune%20(Welcome%20Fragrance)%20(tablety)-detail)
- [13] Organic Chinese Herbs. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://organicchineseherbs.ca/product/yu-xing-cao/>

- [14] Kim S. K., Ryu S. Y., No J., Choi S. U., Kim Y. S. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Archives of Pharmacal Research*. 2001, **24**(6), 518-521. ISSN 02536269.
- [15] Biological Library. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id98809/>
- [16] Lu H. M., Liang Y.Z., Yi L.Z., Wu X.J. Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection. *Journal of ethnopharmacology*. 2006, **104**(1-2), 245-249, ISSN 03788741.
- [17] Chiow K. H., Phoon M. C., Putti T., Tan B. K. H., Chow V.T. Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016, **9**(1), 1-7. ISSN 19957645.
- [18] Huh E., Kim H. G., Park H. *et al.* *Houttuynia cordata* Improves Cognitive Deficits in Cholinergic Dysfunction Alzheimer's Disease-Like Models. *Biomolecules & therapeutics*. 2014, **22**(3), 176-183, ISSN 19769148.
- [19] Li G., Chai O. H., Lee M. S. *et al.* Inhibitory Effects of *Houttuynia cordata* Water Extracts on Anaphylactic Reaction and Mast Cell Activation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2005, **28**(10), 1864-1868, ISSN 09186158.
- [20] Kim J., Cho Y. J., Pan J. H. *et al.* Antiatherogenic and antioxidative effects of *Houttuynia cordata* extracts in rats fed a high-fat diet. *Food Science and Biotechnology*. 2014, **23**(6), 2069-2074. ISSN 12267708.
- [21] Pan F., Lu Z. Q., Chen Q. *et al.* Endophytic fungus strain 28 isolated from *Houttuynia cordata* possesses wide-spectrum antifungal activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, **47**(2), 480-488, ISSN 15178382.
- [22] Lee J. H., Ahn J., Kim J. W., Lee S. G., Kim H. P. Flavonoids from the aerial parts of *Houttuynia cordata* attenuate lung inflammation in mice. *Archives of Pharmacal Research*. 2015, **38**(7), 1304-1311 ISSN 02536269.
- [23] Chen Y. Y., Liu T. F., Chen CH. M., Chao P. Y., Chang T. J. A study of the antioxidative and antimutagenic effects of *Houttuynia cordata* Thunb. using an oxidized frying oil-fed model. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2003, **49**(5), 327-333, ISSN 03014800.
- [24] Leardkamolkarn V., Sirigulpanit W., Phurimsak CH. *et al.* THE INHIBITORY ACTIONS OF HOUTTUYNIA CORDATA AQUEOUS EXTRACT ON DENGUE VIRUS AND DENGUE-INFECTED CELLS. *Journal of food biochemistry*. 2012, **36**(1), 86-92. ISSN 01458884.

- [25] Kwon T.K., Kim J. CH. In vitroskin permeation and anti-atopic efficacy of lipid nanocarriers containing water soluble extracts of *Houttuynia cordata*. *Drug development and industrial pharmacy*. 2014, **40**(10), 1350-1357. ISSN 03639045.
- [26] Ma Q., Guo Y., Liu W. *et al.* Phenylethanoid Glycosides from *Houttuynia cordata* and Their Hepatoprotective Activities. *Chemistry of Natural Compounds*. 2016, **52**(4), 761-763. ISSN 00093130.
- [27] Hung P. Y., Ho B. CH., Lee S. Y. *et al.* *Houttuynia cordata* Targets the Beginning Stage of Herpes Simplex Virus Infection. *PLoS One*. 2015, **10**(2), 1-19. ISSN 19326203.
- [28] Sekita Y., Murakami K., Yumoto H. *et al.* Preventive Effects of *Houttuynia cordata* Extract for Oral Infectious Diseases. *BioMed Research International*. 2016, **2016**, 1-8. ISSN 23146133.
- [29] Wan CH. F., Zheng L. L., Liu Y., Yu X. *Houttuynia cordata* Thunb reverses oxaliplatin-induced neuropathic pain in rat by regulating Th17/Treg balance. *American journal of translational research*. 2016, **8**(3), 1609-1614. ISSN 19438141.
- [30] Hsu CH. CH., Yang H. T., Ho J. J., Yin M. CH., Hsu J. Y. *Houttuynia cordata* aqueous extract attenuated glycativ and oxidative stress in heart and kidney of diabetic mice. *European Journal of Nutrition*. 2016, **55**(2), 845-854. ISSN 14366207.
- [31] Satthakarn S., Hladik F., Promsong A., Nittayananta W. Vaginal innate immune mediators are modulated by a water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015, **15**(1), 183-183. ISSN 14726882.
- [32] Kang CH. K., Hah D. S., Kim CH. H., Kim E., Kim J. S. Evaluation of the Genotoxicity of Extracts of *Houttuynia cordata* Thunb. *The American journal of Chinese medicine (1979)*. 2012, **40**(5), 1019-1032. ISSN 0192415X.
- [33] Parker S., May B., Zhang C. *et al.* A Pharmacological Review of Bioactive Constituents of *Paeonia lactiflora* Pallas and *Paeonia veitchii* Lynch. *PTR. Phytotherapy research*. 2016, **30**(9), 1445-1473. ISSN 0951418X.
- [34] Shi Y. H., Zhu S., Tamura T. *et al.* Chemical constituents with anti-allergic activity from the root of *Edulis Superba*, a horticultural cultivar of *Paeonia lactiflora*. *Journal of Natural Medicines*. 2016, **70**(2), 234-240. ISSN 13403443.
- [35] Hsu F. L., Lai Ch. W., Cheng J. T. Antihyperglycemic Effects of Paeoniflorin and 8-Debenzoylpaeoniflorin, Glukosides from the Root of *Paeonia lactiflora*. 1997, **63**(4), 323-325. ISSN 00320943.

- [36] Fine Gardening. [online]. [cit. 2017-04-24]. Dostupné <https://www.finegardening.com/common-garden-peony-paeonia-lactiflora>
- [37] Terrain. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://www.terrain.net.nz/bulrush-typha-orientalis.html>
- [38] Valíček P. Léčivé rostliny Číny a Vietnamu, 2. díl. Benešov: Start, 2010, 351. ISBN 978-80-86231-52-5.
- [39] Yu X., Azietaku J. T., Li J. et al. Simultaneous determination of eight flavonoids in plasma using LC-MS/MS and application to a pharmacokinetic study after oral administration of *Pollen Typhae* extract to rats. *Journal of Chromatography B*. 2017, 1044, 158-165. ISSN 15700232.
- [40] Tradiční čínská medicína. [online]. [cit. 2017-03-03]. Dostupné <https://www.cinskamedicina-vm.cz/www-cinskamedicina-vm-cz/eshop/0/3/5/122-PILULKA-TYRKYSOVEHO-DRAKA-001>
- [41] Tradiční čínská medicína. [online]. [cit. 2017-03-03]. Dostupné <https://www.cinskamedicina-vm.cz/www-cinskamedicina-vm-cz/eshop/0/3/5/33-ZVELEBENI-RUMELKOVEHO-POLE-055>
- [42] Tradiční čínská medicína. [online]. [cit. 2017-03-03]. Dostupné <https://www.cinskamedicina-vm.cz/www-cinskamedicina-vm-cz/eshop/0/3/5/34-RUST-HORY-TCHAJ-056>
- [43] Tradiční čínská medicína. [online]. [cit. 2017-03-03]. Dostupné <https://www.cinskamedicina-vm.cz/www-cinskamedicina-vm-cz/eshop/0/3/5/172-SKORICOVNIKOVA-SMES-P008>
- [44] Active Herb. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://www.activeherb.com/chineseherbs/baishao.shtml>
- [45] Biological Library. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id3227/>
- [46] Biological Library. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id201088/>
- [47] Eherb.com. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://www.eherb.com/article/959/psoralea-corylifolia--babchi/>
- [48] TCM Wiki. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://tcmwiki.com/wiki/bu-gu-zhi>

- [49] Park G. H., Sung J. H., Song H. M., Jeong J. B. Anti-cancer activity of *Psoralea fructus* through the downregulation of cyclin D1 and CDK4 in human colorectal cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2016, **16**(1), 373-373. ISSN 14726882.
- [50] Lee H., Li H., Noh M., Ryu J. H. Bavachin from *Psoralea corylifolia* Improves Insulin-Dependent Glucose Uptake through Insulin Signaling and AMPK Activation in 3T3-L1 Adipocytes. *International journal of molecular sciences*. 2016, **17**(4), 527. ISSN 16616596.
- [51] Dhar P., Gembitski I., Rai P. K. *et al.* A Possible Connection Between Antidiabetic&Antilipemic Properties of *Psoralea corylifolia* Seeds and the Trace Elements Present: A LIBS Based Study. *Food Biophysics*. 2013, **8**(2), 95-103. ISSN 15571858.
- [52] Shoji M., Arakaki Y., Esumi T. *et al.* Bakuchiol is a Phenolic Isoprenoid with Novel Enantiomer-Selective Anti-Influenza A Virus Activity Involving Nrf2 Activation. *Journal of biological chemistry*. 2015, **290**(46), 28001-28017. ISSN 00219258.
- [53] Kim Y. J., Lim H. S., Lee J., Jeong S. J. Quantitative Analysis of *Psoralea corylifolia* Linne and its Neuroprotective and Anti-Neuroinflammatory Effects in HT22 Hippocampal Cells and BV-2 Microglia. *Molecules*. 2012, **21**(8), 1076. ISSN 14203049.
- [54] Valíček P. Léčivé rostliny Číny a Vietnamu, 1. díl. Benešov: Start, 2009, 338. ISBN 978-80-86231-48-8.
- [55] Zhang X., Wenwen Z., Wang Y., Lu J., Chen X. The Chemical Constituents and Bioactivities of *Psoralea corylifolia* Linn.:A Review. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2016, **44**(1), 35-60. ISSN 0192415X.
- [56] Lu H., Zhang L., Liu D., Tang P, Song F. Isolation and Purification of Psoralen and Isopsoralen and their Efficacy and Safety in the Treatement of Osteosarcoma in nude Rats. *African health sciences*. 2014, **14**(3), 641-647. ISSN 16806905.
- [57] Biological Library. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id404777/>

- [58] Feng X. T., Zhai L. N., Wang CH. L. *et al.* Effects of Pollen Typhae total flavone on β -arrestin-2/SRC/ akt signaling in adipose tissues of type 2 diabetic rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2015, **12**(5), 74-78m.v12i5.11. ISSN 01896016.
- [59] Qin F., Sun H. X. Immunosuppressive activity of Pollen Typhae ethanol extract on the immune responses in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2005, **102**(3), 424-429. ISSN 03788741.
- [60] Akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*. [online]. [cit. 2017-01-09]. Dostupné https://old.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/06_Artemia.pdf.
- [61] Scarfamily. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné https://scarfamilyditdajow.com/Whole_Chinese_Herbs_Page-3.htm
- [62] Jackson C. M., Esnouf M. P., Winzor D. J., Duewer D. L. Defining and measuring biological activity: applying the principles of metrology. *Accreditation and Quality Assurance*. 2007, **12**(6), 283-294. ISSN 14320517.
- [63] Knežlík Z., Ruml T. Nepříznivý vliv xenobiotik na lidský organismus a metody jeho testování. *Chemické listy*. 1999, **93**(10), 607-615. ISSN 00092770.
- [64] Šír M. Obecná toxikologie – zjišťování toxicity, informační zdroje a testy toxicity, legislativa. [online]. [cit. 2017-03-01]. Dostupné <https://uchop.vscht.cz/files/uzel/0022265/i8rKPLrw6NL8ssML8w6vVSJr8hMziypVDAyMDQDAA.pdf?redirected>.
- [65] Kubincová P., Novák J., Sovadinová I. Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické listy*. 2016, **110**(2), 118-125. ISSN 00092770.
- [66] The Free Dictionary. [online]. [cit. 2017-03-01]. Dostupné <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/LD50>
- [67] The Free Dictionary. [online]. [cit. 2017-03-01]. Dostupné <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/LC50>
- [68] IUPAC GOLD BOOK. [online]. [cit. 2017-03-01]. Dostupné <https://goldbook.iupac.org/LT06909.html>
- [69] IUPAC GOLD BOOK. [online]. [cit. 2017-03-01]. Dostupné <https://goldbook.iupac.org/NT06911.html>.

- [70] Deranged Physiology. [online]. [cit. 2017-04-25]. Dostupné <https://derangedphysiology.com/files/Pharmacology%20-%20Pharmacodynamics%20-%20Definitions%20of%20median%20doses%20-%20ED50%20LD50%20and%20TD50.pdf>
- [71] Nunes B. S., Carvalho F. D., Guilhermino L. M., Van Stappen G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental pollution*. 2006, **144**(2), 453-462. ISSN 02697491.
- [72] OECD. [online]. [cit. 2017-04-25]. Dostupné <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/more-about-oecd-test-guidelines.htm>.
- [73] Jelínek J., Zicháček V. Biologie pro gymnázia, 8. vydání. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2006, 81-120. ISBN 80-7182-217-5.
- [74] Zoologie pro veterinární mediky. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <http://www.zoologie.frasma.cz/mmp%200213%20korysi/kor%C3%BD%C5%A1i.html>
- [75] Biological Library. [online]. [cit. 2017-03-02]. Dostupné <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id32611/>
- [76] Dr. Guiseppe MAZZA. [online]. [cit. 2017-04-24]. Dostupné <https://www.photomazza.com/?Artemia-salina&lang=en>.
- [77] Zhang Q., Li J., Zhang W. *et al.* Acute and sub-chronic toxicity studies of honokiol microemulsion. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2015, **71**(3), 428-436. ISSN 02732300.
- [78] Ueng T. H., Kang J. J., Wang H. W., Lin P. CH. An overview of the toxicology of commonly used Traditional Chinese medicine. *Journal of Food and Drug Analysis*. 1997, **5**(4), 241-264. ISSN 10219498.
- [79] Chiow K. H., Phoon M. C., Putti T., Tan K. H., Chow V. T. Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata Thunb.* Extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016, **9**(1), 1-7. ISSN 19957645.

9 PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obrázek 1: <i>Magnolia officinalis</i> © ^[4]	12
Obrázek 2: <i>Magnoliae officinalis cortex</i> © ^[7]	13
Obrázek 3: Magnolol	13
Obrázek 4: <i>Houttuynia cordata</i> © ^[10]	16
Obrázek 5: <i>Houttuyniae herba</i> © ^[13]	17
Obrázek 6: Houttuynin	18
Obrázek 7: <i>Paeonia lactiflora</i> © ^[36]	20
Obrázek 8: <i>Paeoniae radix alba</i> © ^[44]	21
Obrázek 9: Paeonol.....	22
Obrázek 10: <i>Psoralea corylifolia</i> © ^[47]	24
Obrázek 11: <i>Psoraleae fructus</i> © ^[48]	25
Obrázek 12: Psoralen.....	25
Obrázek 13: <i>Typha orientalis</i> © ^[37]	27
Obrázek 14: <i>Typhae pollen</i> © ^[61]	28
Obrázek 15: Isorhamnetin	29
Obrázek 16: <i>Artemia salina</i> © ^[76]	33
Obrázek 17: Mikrotitrační destička (foto autor).....	37
Obrázek 18: Závislost mortality artémií na koncentraci extraktu <i>Magnoliae officinalis cortex</i>	40
Obrázek 19: Závislost mortality artémií na koncentraci extraktu <i>Houttuyniae herba</i>	42
Obrázek 20: Závislost mortality artémií na koncentraci extraktu <i>Psoraleae fructus</i>	44
Obrázek 21: Závislost mortality artémií na koncentraci extraktu <i>Typhae pollen</i>	46

10 PŘEHLED TABULEK

Tabulka 1: Přípravky obsahující <i>Magnoliae officinalis cortex</i> ^{[5][6]}	12
Tabulka 2: Produkty obsahující <i>Houttuyniae herba</i> ^[12]	17
Tabulka 3: Produkty obsahující <i>Paeoniae radix alba</i> ^{[40][41][42][43]}	21
Tabulka 4: Hmotnosti a výtěžek extraktů	35
Tabulka 5: Složení laboratorní mořské vody	36
Tabulka 6: Naměřené mortality extraktu <i>Magnoliae officinalis cortex</i> (průměr ze 3 měření)	39
Tabulka 7: Hodnoty LC ₅₀ extraktu <i>Magnoliae officinalis cortex</i>	40
Tabulka 8: Naměřené mortality extraktu <i>Houttuyniae herba</i> (průměr ze 3 měření)	41
Tabulka 9: Hodnoty LC ₅₀ extraktu <i>Houttuyniae herba</i>	42
Tabulka 10: Naměřené mortality extraktu <i>Psoraleae fructus</i> (průměr ze 3 měření)	43
Tabulka 11: Hodnoty LC ₅₀ extraktu <i>Psoraleae fructus</i>	44
Tabulka 12: Naměřené mortality extraktu <i>Typhae pollen</i> (průměr ze 3 měření)	45
Tabulka 13: Hodnoty LC ₅₀ extraktu <i>Typhae pollen</i>	46

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Martina Vítková

Školitel: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Název diplomové práce:

Biologická aktivita vybraných drog tradiční čínské medicíny

Předmětem této diplomové práce bylo připravit vodné extrakty pěti vybraných drog z tradiční čínské medicíny a zabývat se jejich biologickými účinky. Konkrétně šlo o *Magnoliae officinalis cortex*, *Houttuyniae herba*, *Paeoniae radix alba*, *Psoraleae fructus* a *Typhae pollen*. Tyto drogy mají vysoký potenciál k používání v naší medicíně díky jejich blahodárným účinkům na lidský organismus.

Teoretická část obsahuje popis jednotlivých drog a jejich terapeutických účinků. Jsou zde také popsány metody testování toxicity. V experimentální části je popsán průběh testu akutní toxicity použitých drog na modelovém organismu *Artemia salina*. Jako výstupní údaj byla použita hodnota LC_{50} .

Testování pomocí *Artemia salina* prokázalo nízkou toxicitu testovaných drog. U *Magnoliae officinalis cortex* byla naměřena LC_{50} 0,6613 mg/ml, u *Psoraleae fructus* 1,777 mg/ml, u *Houttuyniae herba* 4,079 mg/ml a u *Typhae pollen* 4,34 mg/ml. U *Paeoniae radix alba* nebyla naměřena žádná toxicita ani při nejvyšší měřené koncentraci, tedy při 15 mg/ml.

Klíčová slova: *Magnoliae officinalis cortex*, *Houttuyniae herba*, *Paeoniae radix alba*, *Psoraleae fructus* a *Typhae pollen*, *Artemia salina*, akutní toxicita

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Martina Vítková

Supervisor: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of diploma thesis:

The biological activity of the selected drugs of traditional Chinese medicine

The subject of this diploma thesis was to prepare aqueous extracts of five selected drugs from traditional Chinese medicine and deal with their biological effects. Namely it was *Magnoliae officinalis cortex*, *Houttuyniae herba*, *Paeoniae radix alba*, *Psoraleae fructus* and *Typhae pollen*. These drugs have a high potential for use in our medicine due to their beneficial effects on the human organism.

The theoretical part contains a description of individual drugs and their therapeutic effects. Also there are described methods of toxicity testing. The experimental part describes the course of the acute toxicity test of used drugs on the model organism *Artemia salina*. LC₅₀ was used as the endpoint.

Testing with *Artemia salina* showed low toxicity of the tested drugs. For *Magnoliae officinalis cortex* the LC₅₀ was found to be 0,6613 mg/ml, *Psoraleae fructus* 1,777mg/ml, *Houttuyniae herba* 4,079 mg/ml and *Typhae pollen* 4,34 mg/ml. No toxicity was detected for *Paeoniae radix alba* even at the highest measured concentration which was 15 mg/ml.

Keywords: *Magnoliae officinalis cortex*, *Houttuyniae herba*, *Paeoniae radix alba*, *Psoraleae fructus* a *Typhae pollen*, *Artemia salina*, acute toxicity